

# アイソザイムによるノリの集団構造に関する遺伝学的研究

|     |   |
|-----|---|
| 著者  | Patricia Liliana Gil Kodaka   |
| 号   | 425   |
| 発行年 | 1990  |
| URL | <a href="http://hdl.handle.net/10097/16659">http://hdl.handle.net/10097/16659</a> |

|                   |   |
|-------------------|---|
| 氏 名(本籍)           | <small>パトリシア</small> Patricia <small>リリアナ</small> Liliana <small>ヒル</small> Gil <small>コダカ</small> Kodaka |
| 学 位 の 種 類         | 博 士 (農 学)   |
| 学 位 記 番 号         | 農 博 第 4 2 5 号   |
| 学位授与年月日           | 平 成 3 年 3 月 28 日  |
| 学位授与の要件           | 学位規則第 5 条第 1 項該当  |
| 研 究 科 専 攻         | 東北大学大学院農学研究科<br>(博士課程) 水産学専攻  |
| 学 位 論 文 題 目       | アイソザイムによるノリの集団構造に関する遺伝学的研究  |
| 論 文 審 査 委 員 (主 査) | 教 授 藤 尾 芳 久<br>教 授 谷 口 旭<br>教 授 秦 正 弘   |

# 論文内容要旨

アマノリは日本ではおよそ30種が報告されている。自然の岩の表面に育つ岩ノリの生産は、養殖ノリの生産量よりかなり少ない。岩ノリの代表種としてウップルイノリがある。スサビノリは水温と塩分濃度にたいして広い適応性をもつためにアサクサノリに代わって日本の代表的養殖ノリとなった。また、この種から選択されて作られたものとしてナラワスサビノリがある。

ノリの生活史は半数体( $n$ )の葉体から雌雄の配偶子が形成され、受精して2倍体( $2n$ )の糸状体を形成する。これが減数分裂して半数体( $n$ )の殻胞子となり、これが発芽して葉体になる。葉体は成熟する前に単胞子をつくり栄養繁殖をする。一方、養殖ノリは常に保存された糸状体から殻胞子を取ってノリ網に付着させ冷凍保存したものを使っている。このように自然および養殖において特有の繁殖の仕方をするノリが世代間でどのように遺伝子を伝えているのか、さらに自然と養殖ノリがどのような集団構造をしているのかを明らかにすることはノリの育種にとって重要である。

本研究はアイソザイム遺伝子を用いてノリの集団構造を遺伝学的に明らかにするために ①ノリ葉体のアイソザイムの検出方法について検討し、②スサビノリの自然集団の遺伝的変異と遺伝的分化を定量し、③野生ノリのクローンが季節的に変化をするかどうかを明らかにし、④スサビノリの自然集団と養殖集団の遺伝的差異を調べ、さらに ⑤アイソザイムのヘテロ型を示す突然変異体を発見し、その特徴を明らかにした。

## 第1章：ノリ葉体のアイソザイムの検出

採集した50mg以上の葉体はろ紙で水分を取り除き、電気泳動実験前まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。アイソザイムの検出は水平式デンブングル電気泳動により行った。ノリは多糖類を多く含むことから、葉体からの酵素の抽出液の取り方の改良が必要である。そこで、ホモジナイズする時に加える緩衝液の種類及び量を検討したところ、4倍の蒸留水よりも0.5Mサッカロースの2倍の量で、石英砂を入れて、潰すとよいことがわかった。この方法により、調べた ACP, AK, ADH, ALD, ALP, AAT, CAT, DIA, EST, GAD, GPI, G6PD, GDH,  $\alpha$  GPD, IDH, LAP, MDH, ME, MPI, ODH, PGM, 6PGD, SDH, SOD の24酵素の内、17酵素(AK, ALP, AAT, CAT, DIA, EST, GPI, G6PD, GDH, IDH, LAP, MDH, MPI, ODH, PGM, 6PGD, SOD)で活性がみられ、AK, ALP, EST, ODHを除く13酵素で安定したバンドの発現がみられ13遺伝子座が推定できた。以上の結果とMiura *et al.*の結果との比較をTable 1に示す。

## 第2章：スサビノリの自然集団の遺伝的変異と遺伝的分化の定量化

アイソザイム遺伝子を用いて自然におけるスサビノリの遺伝的変異性と遺伝的分化の程度を調べた。葉体の採集は1984年に宮城県内の谷川、泊浜、七ヶ浜の3地域で、1985年には同一地域（泊浜）における5地点で行った。遺伝子頻度は表現型から計算した。平均ヘテロザイゴシティ（H）は遺伝子頻度から求めた。遺伝的分化の程度はFstで表した。その結果、異なる3地域間では多型遺伝子座の割合（P）が0.333、平均対立遺伝子数（A/L）は1.6、平均ヘテロザイゴシティ（H）は0.127、Fst値は平均は0.416であった。同地域の5つの異なる地点間ではPは0.763、A/Lは2.2、Hは0.239、Fst値は平均0.063となった（Table 2）。即ち自然集団において、遺伝的変異性は高く、地域間での分化は大きく、同地域内でも魚類との比較から見ると大きな分化の程度を示した。これらのことからノリは自然において多くのパッチ状の繁殖集団を形成していることがわかった。その原因として自家受精と栄養繁殖によるクローン繁殖が考えられる。

## 第3章：野生ノリの季節的な遺伝的变化

同じ採集地点に出現する野生ノリクローンが季節的に変化するかどうかを調べるために福島県の相馬新港の海岸から沖合の3地点で1987年11月から1988年4月まで採集した。その結果、3地点での11遺伝子座の対立遺伝子頻度において時期による変化がみられた。三浦ら（1980）と原ら（1986）によって報告されたアイソザイムの連鎖からAat-Cat-Dia-Gpi-Mpi-6Pgd-G6pd-Sod-Pgm-Mdh-Gdhの1つの連鎖群は明かにされている。1つの連鎖群で同一の対立遺伝子の組み合わせを示す葉体は同一のクローン由来と考えられ、11遺伝子座の対立遺伝子の組み合わせを定めて、主体をなす対立遺伝子の組み合わせが時期的に変化したので、クローンの出現の交代が考えられた（Table 3）。GpiとSod遺伝子座のA'とB対立遺伝子はウップルイノリのクローンであることがわかった。このクローンは11月から1月の間に出現し、ウップルイノリのクローンの消失に伴ってスサビノリのクローンが出現した。さらに新しいスサビノリのクローンが3月から4月に出現した。このようなクローンの交代はノリ集団の時期による遺伝子頻度変化をもたらす原因と考えられた。

#### 第4章： スサビノリの自然集団と養殖集団の遺伝的差異

1986年2月に宮城県の七ヶ浜で11の異なる地点から養殖スサビノリ葉体を採集し、アイソザイムを調べた。その結果、 $P$ は0.058、 $A/L$ は1.0、 $H$ は0.010となり、自然集団に比べて遺伝的変異性が著しく小さいことがわかった。Aat-Cat-Dia-Gpi-Mpi-6PgD-G6pd遺伝子座の連鎖群において、自然では多くの対立遺伝子の組み合わせがみられたが、養殖ノリではほとんどの葉体は1つの組み合わせになっていた(Table 4)。このことから、養殖集団はスサビノリ由来で1つの葉体由来のクローンからなっていることがわかった。

#### 第5章： アイソザイムのヘテロ型の発見

Porphyra sp. の野生葉体は1984年から1989年の間に福島県の松川浦内の7つの異なる地点で、養殖葉体は松川浦養殖場の3つの異なる地点から採集した。ノリ葉体は11遺伝子座を調べ、その内GpiとMpiは単祖の葉体からは期待されない3本あるいは2本バンドを示すヘテロ型が観察された。松川浦から天然採苗した養殖ノリでも同じヘテロ型が見られた。このヘテロ型である葉体は松川浦のどの地点でも、どの時期でもみられることがわかった(Table 5)。この葉体は形態からアサクサノリの突然変異体と考えられ、Porphyra sp. とした。このPorphyra sp. とスサビノリとウップルイノリの遺伝子頻度からNeiの遺伝的距離をもとめた(Table 6)。Porphyra sp. とスサビノリの間は0.1207で、Porphyra sp. とウップルイノリの間は0.8960で、スサビノリとウップルイノリの間では0.9742で、このことから Porphyra sp. は遺伝的にスサビノリに類似していることがわかった。三浦によればアサクサノリとスサビノリとの遺伝的距離は0.240であった。このことと形態がアサクサノリに近いことから、Porphyra sp. はアサクサノリの1本の染色体が倍加した突然変異体と考えられ、ノリの生活史から、この突然変異体は松川浦で広がったクローンと考えられた。

#### ま と め

ノリの集団構造はいくつかのクローンによって構成され、これらのクローンは時期によって入れ代わっていることが明らかになった。更に、福島県松川浦でアイソザイムがヘテロ型になっている葉体を発見し、その起源はアサクサノリの突然変異体クローンであることが考えられた。

Table 1 Comparison of the used methods for the extraction of enzymes from the thalli of *Porphyra yezoensis*.

| PRESENT METHOD  | MIURA et al. METHOD                                       |
|---|---|
| Collection  | Collection  |
| Storage at $-80^{\circ}\text{C}$  | Storage at $-20^{\circ}\text{C}$                          |
| Grinding with small amounts of quartz sands and 2 volumes* of 0.5M saccharose solution. | Grinding with 4 volumes* of distilled water.              |
| Electrophoresis   | Electrophoresis   |
| - Electrode buffer (pH 7.0)<br>0.135M tris-0.043M citrate                               | - Electrode buffer (pH 7.0)<br>0.155M tris-0.043M citrate |
| - Gel buffer (pH 7.0)<br>1/10 electrode buffer  | - Gel buffer (pH 7.0)<br>1/10 electrode buffer            |
| - 300V x 4 hours  | - 200V x 5 hours  |

\* 1 volume : weight of thallus

Table 2 Summary of the genetic variation in natural populations of *Porphyra yezoensis*.

|                                | Different localities   | Same locality          |
|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| Number of loci examined        | 12                     | 11                     |
| Number of localities or sites  | 3                      | 5                      |
| Proportion of polymorphic loci | 0.333                  | 0.763<br>(0.727-0.818) |
| Average heterozygosity         | 0.127<br>(0.100-0.141) | 0.239<br>(0.198-0.274) |
| Mean of $F_{st}$               | 0.416                  | 0.063                  |

Table 3 Distribution of the allelic combinations in natural population of *Porphyra* collected from Soumashinko.

| Type of Allelic Combinations  |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               | Collection Date |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>1</sub> A <sub>2</sub> | C <sub>1</sub> C <sub>2</sub> | D <sub>1</sub> D <sub>2</sub> | E <sub>1</sub> E <sub>2</sub> | F <sub>1</sub> F <sub>2</sub> | G <sub>1</sub> G <sub>2</sub> | H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> | I <sub>1</sub> I <sub>2</sub> | J <sub>1</sub> J <sub>2</sub> | K <sub>1</sub> K <sub>2</sub> | 1987            | 1987  | 1988  | 1988  | 1988  | 1988  | 1988  |
|                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               | 11.27           | 12.16 | 1.13  | 1.28  | 2.25  | 3.11  | 4.9   |
| N E A R                       |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | (45)  | (105) | (75)  | (90)  | (45)  | (105) |
| 1)                            | A A                           | A A                           | A A                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 1.000 | 0.780 | 0.961 | 1.000 | 0.379 | 0.000 |
| 2)                            | B B                           | B C                           | C A                           | B A                           | B B                           | B A                           | B B                           | B A                           | B A                           | -               | 0.000 | 0.057 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.219 |
| 3)                            | C A                           | B B                           | A B                           | B A                           | B B                           | A B                           | B B                           | A B                           | A B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.562 |
| 4)                            | B A                           | A B                           | C B                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.133 | 0.000 |
| Others                        |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 0.000 | 0.163 | 0.039 | 0.000 | 0.488 | 0.219 |
| No. of allelic comb.          |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 1     | 11    | 4     | 1     | 12    | 6     |
| M I D D L E                   |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | (68)  | (78)  |       |       | (75)  |       |
| 1)                            | A A                           | A A                           | A A                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | 0.000           | 1.000 | -     | -     | -     | 1.000 | -     |
| 5)                            | A A                           | B A                           | A' B                          | A A                           | A A                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | 0.986           | 0.000 | -     | -     | -     | 0.000 | -     |
| Others                        |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 0.014 | 0.000 |       |       | 0.000 |       |
| No. of allelic comb.          |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 2     | 1     |       |       | 1     |       |
| F A R                         |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | (68)  | (38)  | (75)  | (86)  | (95)  | (40)  |
| 1)                            | A A                           | A A                           | A A                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.407 | 0.864 | 0.000 |
| 2)                            | B B                           | B C                           | C A                           | B A                           | B B                           | B A                           | B B                           | B A                           | B A                           | -               | 0.559 | 0.369 | 0.013 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 3)                            | C A                           | B B                           | A B                           | B A                           | B B                           | A B                           | B B                           | A B                           | A B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.186 | 0.000 | 0.000 |
| 6)                            | B B                           | B C                           | C B                           | B A                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.828 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 7)                            | B B                           | B C                           | B A                           | B A                           | B B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.116 | 0.000 | 0.000 |
| 8)                            | A A                           | A A                           | A A                           | A B                           | A B                           | B B                           | B B                           | B B                           | B B                           | -               | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| 9)                            | A A                           | B A                           | A A                           | A A                           | B B                           | B A                           | B B                           | A A                           | A A                           | -               | 0.102 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 10)                           | A A                           | A A                           | A' B                          | A A                           | B B                           | B B                           | B B                           | A A                           | A A                           | -               | 0.000 | 0.132 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 11)                           | B B                           | A A                           | A' B                          | A A                           | B B                           | B B                           | B B                           | A A                           | A A                           | -               | 0.000 | 0.132 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Others                        |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 0.339 | 0.367 | 0.159 | 0.291 | 0.136 | 0.000 |
| No. of allelic comb.          |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                               |                 | 13    | 14    | 10    | 9     | 10    | 1     |

( ): Number of thalli, - : No collection

Others: Allelic combinations with frequencies lesser than 0.100.

Table 4 Distribution of the allelic combinations observed in cultured and natural populations of *Porphyra yezoensis*.

| TYPE OF ALLELIC COMBINATIONS  | CULTURED POPULATION<br>COLLECTION SITES IN SHICHIGAHAMA |       |       |       |       | NATURAL POPULATION<br>COLLECTION SITES<br>IN TOMARIHAMA |         |         |
|---|---|-------|-------|-------|-------|---|---------|---------|
|   | 1,2,3,4<br>5,8,11                                       |       |       |       |       | 1   | 2       | 3       |
|   | 6   | 7     | 9     | 10    |       |   |         |         |
| (1) <u>B B B C C A B</u>  | 1.000   | 0.932 | 0.803 | 0.879 | 0.815 | 0.799   | 0.593   | 0.104   |
| (2) <u>B B B D C A B</u>  | 0.000   | 0.034 | 0.033 | 0.091 | 0.000 | 0.000   | 0.000   | 0.000   |
| (3) <u>B B B D D A B</u>  | 0.000   | 0.034 | 0.033 | 0.000 | 0.000 | 0.000   | 0.000   | 0.000   |
| (4) <u>B A B D D A B</u>  | 0.000   | 0.000 | 0.115 | 0.030 | 0.111 | 0.000   | 0.000   | 0.000   |
| (5) <u>B B B C D A B</u>  | 0.000   | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.018 | 0.000   | 0.051   | 0.000   |
| (6) <u>B B B D D A C</u>  | 0.000   | 0.000 | 0.016 | 0.000 | 0.056 | 0.000   | 0.000   | 0.000   |
| (7) <u>B A B C C A B</u>  | 0.000   | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000   | 0.000   | 0.139   |
| Others  | 0.000   | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.201   | 0.356   | 0.757   |
| No. of thalli tested  | 259   | 58    | 61    | 33    | 54    | 15  | 59      | 29      |
| No. of allelic combinations   | 1/1   | 3/4   | 5/8   | 3/8   | 4/16  | 4/512   | 18/1944 | 14/1152 |
| Numerator/Denominator : Observed/Expected number of allelic combination |   |       |       |       |       |   |         |         |



Table 5. Allele frequencies at Gpi and Mpi isozyme loci observed in wild thalli of Porphyra sp. (Matsukawaura)

a) Thalli collected annually

| Locus<br>&<br>Allele | 1984<br>03.26 | 1986<br>03.28 | 1987<br>03.23 | 1988<br>03.11 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <u>Gpi</u> <u>A</u>  | 0.012         | 0.017         | 0.000         | 0.000         |
| <u>B</u>             | 0.000         | 0.000         | 0.009         | 0.000         |
| <u>C</u>             | 0.082         | 0.000         | 0.000         | 0.000         |
| <u>AC</u>            | 0.906         | 0.983         | 0.991         | 1.000         |
| <u>Mpi</u> <u>A</u>  | 0.000         | 0.000         | 0.063         | 0.000         |
| <u>B</u>             | 0.141         | 0.048         | 0.078         | 0.000         |
| <u>AB</u>            | 0.113         | 0.121         | 0.250         | 0.283         |
| <u>BC</u>            | 0.746         | 0.831         | 0.609         | 0.717         |

b) Thalli collected monthly

| Locus<br>&<br>Allele | 1988<br>01.13 | 1988<br>02.25 | 1988<br>03.11 | 1988<br>04.09 |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <u>Gpi</u> <u>AC</u> | 1.000         | 1.000         | 1.000         | 1.000         |
| <u>Mpi</u> <u>B</u>  | 0.250         | 0.000         | 0.000         | 0.000         |
| <u>AB</u>            | 0.100         | 0.367         | 0.283         | 0.400         |
| <u>BC</u>            | 0.650         | 0.633         | 0.717         | 0.600         |

c) Thalli collected from different sites

| Locus<br>&<br>Allele | Funa-<br>tsukiba | Kiuchi-<br>shima | Iwano-<br>kohama | Koko-<br>mae |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|--------------|
| <u>Gpi</u> <u>A</u>  | 0.000            | 0.014            | 0.000            | 0.008        |
| <u>C</u>             | 0.066            | 0.472            | 0.038            | 0.055        |
| <u>AC</u>            | 0.934            | 0.514            | 0.962            | 0.937        |
| <u>Mpi</u> <u>A</u>  | 0.091            | 0.080            | 0.000            | 0.000        |
| <u>B</u>             | 0.345            | 0.560            | 0.038            | 0.049        |
| <u>C</u>             | 0.091            | 0.080            | 0.000            | 0.032        |
| <u>AB</u>            | 0.128            | 0.053            | 0.453            | 0.032        |
| <u>BC</u>            | 0.345            | 0.227            | 0.509            | 0.887        |

Table 6 Estimates of genetic variability and genetic distance among 3 species of *Porphyra*. Values above the diagonal are the estimates of genetic similarity and those below are the estimates of genetic distance.

|                          | <u>Porphyra</u> sp. | <u>P. yezoensis</u> | <u>P. pseudolinearis</u> |
|--------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| <u>Porphyra</u> sp.      |                     | 0.8863              | 0.4082                   |
| <u>P. yezoensis</u>      | 0.1207              |                     | 0.3775                   |
| <u>P. pseudolinearis</u> | 0.8960              | 0.9742              |                          |

## 審査結果の要旨

ノリは糸状体の培養、人工採苗、冷凍ノリタネ網の保存などの養殖技術が発展しているが、それに使われている種苗や養殖されている葉体の遺伝的特徴はあまり知られていない。本研究は、ノリの自然集団と養殖集団の遺伝的変異性と遺伝的分化の面からとらえ、ノリの集団構造を明らかにしようとしておこなっている。

第一に、動物で使われているアイソザイム分析法では検出が難しかったノリのアイソザイムを検出する方法を明らかにし、13酵素を支配する13遺伝子座を推定している。

これを用いて、スサビノリの自然集団が地域間で大きな分化を示し、さらに同じ地域でも場所によって遺伝的分化がみられることを見だし、自家受精と栄養繁殖によって増えるクローン繁殖であることを示している。

これをアイソザイムの連鎖群を指標として同一地域での異なる地点について変化を調べ、遺伝子頻度の時期的変化が各地点におけるクローンの交代によってもたらされていることを示した。また、養殖集団は自然集団に比べて遺伝的変異性が顕著に低く、自然集団でみられた一つのクローンから由来していることを明らかにしている。

さらに、福島県松川浦で繁殖しているノリの自然集団および養殖集団が、半数体の葉体であるにもかかわらず、アイソザイム遺伝子がヘテロとみられる葉体を発見し、これが他の種との比較によりアサクサノリの突然変異体であることを示し、松川浦で広がったクローンであることを示唆している。

本研究は、ノリの集団構造がクローン構成で、クローンの消長によっていることを明らかにし、ノリには突然変異によってできたクローンが広がった地域を示したことから、ノリの育種研究の展開に大きく役立つ可能性を示した。よって、農学博士の学位を授与する価値があると判断する。